



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Patentschrift  
⑯ DE 197 10 497 C2

⑯ Int. Cl. 6:  
A 61 K 39/395  
C 07 K 16/28

DE 197 10 497 C2

⑯ Aktenzeichen: 197 10 497-5-41  
⑯ Anmeldetag: 13. 3. 97  
⑯ Offenlegungstag: 5. 3. 98  
⑯ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 9. 7. 98

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑯ Innere Priorität:  
196 35 743. 8 03. 09. 96  
196 48 976. 8 26. 11. 96

⑯ Patentinhaber:  
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und  
Gesundheit GmbH Neuherberg, 85764  
Oberschleißheim, DE

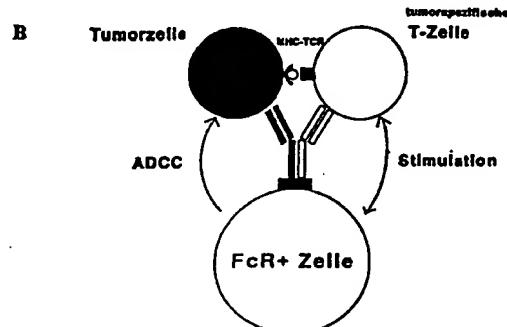
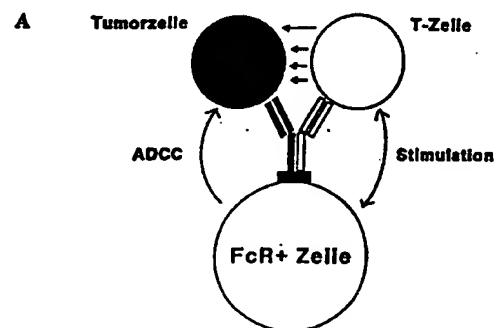
⑯ Vertreter:  
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner, 80801  
München

⑯ Erfinder:  
Lindhofer, Horst, Dr., 82194 Gröbenzell, DE; Kolb,  
Hans-Jochem, Prof. Dr., 80804 München, DE;  
Thierfelder, Stefan, Prof. Dr., 82223 Eichenau, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
DE 44 19 399 C1

⑯ Verwendung Bi- und trispezifische Antikörper zur Induktion einer Tumorimmunität

⑯ Verwendung eines intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers mit den nachfolgenden Eigenschaften und Wirkungen:  
(a) bindet an eine T-Zelle und vermittelt ihr ein 1. Aktivierungssignal;  
(b) bindet an tumorassoziierte Antigene auf einer Tumorzelle;  
(c) bindet durch seinen Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen;  
(d) aktiviert die Fc-Rezeptor positive Zelle durch seine Bindung an die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Cytokinen und/oder von kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird;  
(e) die kostimulatorischen Antigene übertragen an die T-Zelle zumindest ein 2. Aktivierungssignal, das für eine physiologische Aktivierung der T-Zelle benötigt wird, wobei sich diese Aktivierung in der Hochregulation von Aktivierungsmarkern, der Zerstörung der Tumorzelle und/oder in einer Proliferation der T-Zelle zeigt;  
zur Induktion einer Tumorimmunität bei Mensch und Tier.



DE 197 10 497 C2

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Verwendung intakter bispezifischer Antikörper zur Induktion einer Tumorimmunität bei Mensch und Tier.

5 Maligne Erkrankungen des Menschen, beispielsweise Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium, haben trotz der Fortschritte der Chemo- und Radiotherapie in den letzten Jahren noch immer eine äußerst ungünstige Prognose. Eine Heilung dieser Erkrankungen ist nicht möglich. Es ist daher notwendig, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln. Große Hoffnungen werden dabei auf immuntherapeutische Ansätze gesetzt, mittels derer das Immunsystem des Patienten dazu gebracht werden soll, den Tumor abzustoßen. Es ist bekannt, daß auf Tumorzellen tumorassoziierte Antigene vorkommen und daß das Immunsystem prinzipiell durchaus in der Lage ist, diese zu erkennen und die malignen Zellen anzugreifen. Tumoren haben jedoch verschiedene Strategien entwickelt, die es ihnen erlauben, sich der Immunantwort zu entziehen. Dies gelingt ihnen z. B. durch ungenügende Präsentation von tumorassoziierten Antigenen und/oder durch unzureichende Aktivierung der in der Regel vorhandenen tumorspezifischen T-Zellen.

Bei etwa 43 000 Neuerkrankungen/Jahr steht Brustkrebs an der Spitze der Krebsstatistik für Frauen in Deutschland. 15 Weniger als ein Drittel der Frauen mit Lymphknotenbefall bei Diagnose leben 10 Jahre ohne Rückfall.

Vor diesem Hintergrund wird seit einigen Jahren versucht, mit Hilfe der autologen Knochenmark- und Blutstammzell-Transplantation in Verbindung mit der Hoch-Dosis-Therapie Patientinnen mit ausgedehntem Lymphknotenbefall und Fernmetastasen eine Lebensverlängerung oder sogar Heilung zu ermöglichen. Trotz hoher Ansprechraten bei der Hoch-Dosis-Therapie ist eine Heilung im metastasierten Stadium selten.

20 Immuntherapeutische Ansätze beim Mamma-Karzinom beschränkten sich bisher auf Methoden zur unspezifischen Stimulation wie die Behandlung mit BCG oder Levamisol, sowie den Einsatz von LAK- und NK-Zellen mit IL-2 (15, 16). Eine Lebensverlängerung konnte mit bisher eingesetzten Formen von Immuntherapie nicht nachgewiesen werden, die Behandlung mit BCG war sogar eher nachteilig (15). Nachdem unspezifische Aktivierungen von Zellen auch bei anderen Tumorarten wenig Erfolg gehabt haben, sollte nun versucht werden, eine spezifische Immunreaktion in Gang zu bringen.

Für die Tumorthерапie wurden beispielsweise T-Zell-redirigierende bispezifische Antikörper verwendet. Diese binden mit einem Bindungsarm an einen T-Zell-Rezeptorkomplex und mit dem zweiten Bindungsarm an ein tumorassoziiertes Antigen auf einer Tumorzelle. Durch die daraus resultierende Aktivierung der T-Zelle und der räumlichen Nähe der Tumorzelle wird letztere durch Apoptose-Induktion bzw. Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder Perforin zerstört.

30 Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues Mittel bereitzustellen, um maligne Erkrankungen des Menschen zu therapiieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die im Anspruch 1 näher gekennzeichneten Merkmale gelöst. Bevorzugte Ausgestaltung der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

35 Die Erfindung offenbart somit die Anwendung intakter bispezifischer oder trispezifischer Antikörper mit den nachfolgenden Eigenschaften und Wirkungen:

- (a) bindet an eine T-Zelle und vermittelt ihr ein 1. Aktivierungssignal;
- (b) bindet an tumorassoziierte Antigene auf einer Tumorzelle;
- (c) bindet durch seinen Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen;
- (d) aktiviert die Fc-Rezeptor positive Zelle durch seine Bindung an die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Cytokinen und/oder kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird;
- (e) die kostimulatorischen Antigene übertragen an die T-Zelle zumindest ein 2. Aktivierungssignal, das für eine physiologische Aktivierung der T-Zelle benötigt wird, wobei sich diese Aktivierung in der Hochregulation von Aktivierungsmakern, der Zerstörung der Tumorzelle und/oder in einer Proliferation der T-Zelle zeigt

45 zur Induktion einer Tumorimmunität bei Mensch und Tier.

Die erfindungsgemäß angewandten Antikörper sind bevorzugt in der Lage, die tumorspezifischen T-Zellen, die über den T-Zell-Rezeptor ein tumorspezifisches Peptid, welches über MHC Klasse I und/oder Klasse II auf Tumorzellen präsentiert wird, erkennen, nach Bindung durch den bispezifischen oder trispezifischen Antikörper, wie unter (e) beschrieben, zu aktivieren.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Antikörper sind weiterhin zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt. Weiterhin sind sie zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort in der Lage.

50 Die Bindung erfolgt bevorzugt über CD3, CD2, CD5, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle. Die Fc-Rezeptor positiven Zellen weisen zumindest einen Fc $\gamma$ -Rezeptor I, II oder III auf.

Erfindungsgemäß verwendbare Antikörper sind zur Bindung an Monozyten, Makrophagen und/oder Dendriten als Fc $\gamma$ -Rezeptor I positive Zellen befähigt.

Die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper bewirken, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Cytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird. Die Cytokine sind bevorzugt IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 und/oder TNF- $\alpha$ .

60 Die Bindung an die T-Zelle erfolgt bevorzugt über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle.

Der erfindungsgemäß anwendbare bispezifische Antikörper ist bevorzugt ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper.

65 Der erfindungsgemäß einsetzbare trispezifische Antikörper ist bevorzugt ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-

und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper mit einem zusätzlichen anti-Fc-Rezeptor-Bindungssarm.

Bezugnehmend auf das Merkmal (a) wird das 1. Signal beispielsweise über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle übertragen und kann damit, für sich allein betrachtet, zu einer unphysiologischen Aktivierung der T-Zelle führen. Die Zelle wird hierdurch anergisiert und kann auf T-Zell-Rezeptor vermittelte Stimuli nicht mehr angemessen reagieren. Durch die erfundungsgemäßen bispezifischen oder trispezifischen Antikörper wird zusätzlich gleichzeitig durch die kostimulatorischen Antigene auf der Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle ein 2. Aktivierungssignal übertragen, das zu einer physiologischen Aktivierung der T-Zelle und in der Folge entweder zu einer Zerstörung der Tumorzelle und/oder einer Proliferation der T-Zelle führt. Als weiteres Kriterium für die Aktivierung der T-Zelle kann die Hochregulation von Oberflächenantigenen wie z. B. CD2, CD25 und/oder CD28 und/oder die Sekretion von Cytokinen wie z. B. IL-2 herangezogen werden.

Mit den erfundungsgemäß verwendeten bsAk werden also T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert. Unspezifische Aktivierungen von T-Zellen hatten in der Immuntherapie generell wenig Erfolg.

Bevorzugte Antikörper sind heterologe bispezifische Antikörper, die aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isootypkombinationen ausgewählt werden:

Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG1,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG3 [orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],  
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,  
Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,  
Maus-IgG2a/Human-IgG3 [kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A; im folgenden mit \* gekennzeichnet]  
Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-CH2-CH3]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-CH2-CH3]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge]-CH2-CH3, orientaler Allotyp]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-CH2-CH3]  
Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4[N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*[CH2-CH3]  
Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*[CH2-CH3]  
Human-IgG2/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\*[C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\*[CH3]  
Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3]  
Maus-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*-CH2-CH3].

Die beiliegenden Abbildungen dienen zur weiteren Veranschaulichung der Erfindung. Die Abbildungen zeigen:

Abb. 1 die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie mit bispezifischen Antikörpern.

Abb. 2 die graphische Darstellung der Ergebnisse des in vivo-Versuchs.

Abb. 3 Beispiel für einen bispezifischen Antikörper der Erfindung.

Abb. 4 Trispezifischer F(ab)<sub>2</sub>-Antikörper

Abb. 5 Trispezifischer scFv-Antikörper.

Die erfundungsgemäße Aufgabe zielt darauf ab, durch eine effiziente T-Zell-Antwort gegen Tumorzellen eine Immunität gegen Tumore, insbesondere eine Langzeit-Tumormunität, zu induzieren. Dies wird erreicht durch Redirektion von T-Zellen an Tumorzellen mittels intakter bispezifischer Antikörper (bsAk) und gleichzeitiger Bindung von Fc-Rezeptor positiven Zellen an den Fc-Teil des bsAk. Wichtig dabei ist, daß die Fc-Rezeptor positive Zelle durch Bindung von (an der T-Zelle bzw. Tumorzelle) immobilisierten intakten bsAk an den Fc-Rezeptor aktiviert wird. Erfundungsgemäß wird unter "Tumor-Langzeitimmunität" ein Zeitraum verstanden, der sich über zumindest mehrere Jahre erstreckt.

Die in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen bispezifischen und trispezifischen Antikörper weisen insbesondere die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Eigenschaften auf, zumindest aber die im Anspruch 1 in den Merkmalen (a)-(e) gekennzeichneten Eigenschaften. Diese Antikörper können somit zur Induktion einer Tumormunität, bevor-

zugt einer Langzeit-Tumorimmunität, bei Mensch und Tier verwendet werden, wobei hierfür insbesondere die unter (a)–(e) des Anspruchs 1 genannten Eigenschaften verantwortlich sind.

Zur Aktivierung der Fc-Rezeptor positiven Zelle durch den bsAk werden bevorzugt spezifische Subklassen bzw. Subklassenkombinationen des bsAk oder bei trispezifischen Antikörpern ein den Fc-Rezeptor erkennender Bindungsarm eingesetzt. Wie in *in vitro* Versuchen nachgewiesen werden konnte, sind bspw. bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG2a/Ratte-IgG2b in der Lage, an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden und diese gleichzeitig zu aktivieren, was zur Hochregulation bzw. Neuausbildung (Expression) von kostimulatorischen Antigenen wie z. B. CD40, CD80 oder CD86 auf der Zelloberfläche dieser Zellen führt. Dagegen sind bsAk der Subklassenkombination Maus-IgG1/Ratte-IgG2b zwar in der Lage an Fc-Rezeptor positive Zellen zu binden (Haagen et al., *Interaction of human monocyte Fcγ receptors with rat IgG2b*, *J. Immunology*, 1995, 154 : 1852–1860), können diese aber offenbar nicht in vergleichbarem Maße aktivieren (Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Weger R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J.E.G. *CD8 T-cell activation after intravenous administration of CD3 × CD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma*, *Cancer Immunol. Immunother.* 40 : 390, 1995).

Während der intakte bsAk die T-Zelle mit einem Bindungsarm (z. B. an CD3 oder CD2) bindet und gleichzeitig aktiviert, können kostimulatorische Signale von der an den Fc-Teil des bsAk gebundenen Fc-Rezeptor positiven Zelle an die T-Zelle übermittelt werden. D.h. erst die Kombination von Aktivierung der T-Zelle über einen Bindungsarm des bsAk und der gleichzeitigen Übertragung von kostimulatorischen Signalen von der Fc-Rezeptor positiven Zelle auf die T-Zelle führt zu einer effizienten T-Zellaktivierung (Abb. 1A). Tumorspezifische T-Zellen, die an der Tumorzelle ungünstig aktiviert wurden und deshalb anerg sind, können durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Prinzip ebenfalls reaktiviert werden (Abb. 1B).

Überraschenderweise konnte somit erfindungsgemäß eine lang andauernde Tumorimmunität durch die erfindungsgemäße Anwendung intakter T-Zell-redirigierender bsAk induziert werden. Diese beruht auf der physiologischen Aktivierung von an den Tumor redirigierten T-Zellen durch 1) Bindung des bsAk an die T-Zelle, beispielsweise über den Zellrezeptor-Komplex, und 2) gleichzeitiger Vermittlung von kostimulatorischen Signalen durch FcR+ Zellen, die an den Fc-Teil des bsAk binden.

Eine wichtige Voraussetzung für eine wirksame Induktion einer Tumorimmunität ist demnach ein bsAk mit einem Fc-Teil, der in der Lage ist, FcR+ Zellen zu binden, die durch dieses Ereignis selbst aktiviert werden und dadurch kostimulatorische Signale an die T-Zelle vermitteln können.

Aufgrund dieses Mechanismus können ebenfalls in Anergie befindliche tumorspezifische T-Zellen (besitzen einen T-Zell-Rezeptor [TCR], welcher tumorspezifische Peptide in Verbindung mit MHC-Molekülen auf der Tumorzelle erkennt) an der Tumorzelle reaktiviert werden und dadurch eine Toleranz gegen den Tumor aufgehoben werden.

Da die tumorspezifischen T-Zellen vollkommen andere Peptide-/Proteine über ihren TCR erkennen können als der bsAk mit seinem anti-Tumor-Bindungsarm, können ebenfalls, nach Aktivierung derartiger T-Zellen durch den bsAk, Tumorzellen erkannt und zerstört werden, die von dem bsAk ursprünglich nicht erkannt werden konnten. D.h. der verwendete bsAk muß nicht alle Tumorzellen erkennen, um eine Tumorimmunität zu induzieren, die später alle Tumorzellen erreicht. Aus dieser Erkenntnis folgt weiterhin, daß relativ wenig intakter bsAk (100 µg–5 mg/Patient) ausreicht, um die erfindungsgemäße Tumorimmunität zu erlangen. Da die Induktion einer derartigen Tumorimmunität eine gewisse Zeit benötigt, sollte der Patient sich, bei Beginn der Therapie, in einer minimal residual disease (MRD)-Situation mit wenigen verbliebenen Tumorzellen befinden. Unter MRD versteht man den Zeitraum nach der Reduktion von größeren Tumormengen mit geeigneten Methoden, wie z. B. der Entfernung des Primärtumors durch chirurgische Maßnahmen, in dem noch residuelle Tumorzellen existieren, die zwar unter Umständen nicht nachweisbar sind, aber nach einer gewissen Zeit zum Rezidiv führen.

Diese hat für die hier beschriebene Therapieform folgende Vorteile:

- 45 – Die Anzahl der Tumorzellen und damit das mögliche Auftauchen von sogenannten "Escape-Mutanten", d. h. von Tumorvarianten, welche z. B. ein tumorspezifisches Peptid, das vom Immunsystem erkannt wird, nicht mehr präsentieren, ist stark reduziert.
- Selbst sehr schnell wachsende und aggressive Tumorvarianten haben nach erfolgter Immunisierung eine geringere Chance, das Immunsystem quasi zu überrennen.

50 Die Hauptunterschiede zu einer konventionellen Krebstherapie mit bsAk liegen

1. in der geringen Menge von verabreichtem Antikörper (5 µg–10 mg, bevorzugt 10 µg–100 µg, weiterhin 100 µg–5 mg/Patient); und
- 55 2. im Zeitpunkt der Gabe des bsAk, bezogen auf das Krankheitsstadium (bevorzugt in einer MRD-Situation). Es wird bei dieser Form der Therapie nicht abgewartet, bis Tumorzellen, z. B. nach Entfernung eines Primärtumors, wieder nachweisbar sind, sondern es wird prophylaktisch durch Gabe des intakten bsAk eine Art Impfung des Patienten gegen seine Krebszellen durchgeführt;
- 60 3. dies ist möglich, da bei derart geringen Mengen von verabreichten intakten bsAk keine schwerwiegenden Nebenwirkungen zu erwarten sind, die den enormen Vorteil – nämlich das Ausbleiben von nicht mehr behandelbaren Metastasen – neutralisieren würden;
4. in der Induktion einer humoralen Immunantwort mit Komplement-fixierenden Antikörpern (beim Menschen die Isootypen IgG1, IgG2 und IgG3), die in der Lage sind, Tumorzellen zu zerstören.

65 Bei den erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörpern handelt es sich vorzugsweise um monoklonale, chimäre, rekombinante, synthetische, halbsynthetische oder chemisch modifizierte intakte Antikörper mit beispielsweise Fv-, Fab-, scFv- oder F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten.

Sind die erfindungsgemäß einsetzbaren Antikörper für eine invivo-Therapie vorgesehen, werden bevorzugt Antikör-

per oder Derivate oder Fragmente vom Menschen verwendet, oder solche, die derart verändert sind, daß sie sich für die Anwendung beim Menschen eignen (sogenannte "humanized antibodies") (siehe z. B. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 (1992), 217; Mocikat et al., Transplantation 57 (1994), 405).

Die Herstellung der verschiedenen oben genannten Antikörpertypen und -fragmente ist dem Fachmann geläufig. Die Herstellung monoklonaler Antikörper, die ihren Ursprung vorzugsweise in Säugetieren, z. B. Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen oder Ziege, haben, kann mittels herkömmlicher Methoden erfolgen, wie sie z. B. in Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495), in Harlow und Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor) oder in Galfré (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3) beschrieben sind.

Ferner ist es möglich, die beschriebenen Antikörper mittels rekombinanter DNA-Technologie nach dem Fachmann geläufigen Techniken herzustellen (siehe Kurucz et al., J. Immunol. 154 (1995), 4576; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sc. USA 90 (1993), 6444).

Die Herstellung von Antikörpern mit zwei verschiedenen Spezifitäten, den sogenannten bispezifischen Antikörpern, ist zum einen durch Anwendung rekombinanter DNA-Technologie möglich, aber auch durch die sogenannte Hybrid-Hybridoma-Fusionstechnik (siehe z. B. Milstein et al., Nature 305 (1983), 537). Hierbei werden Hybridomazelllinien, die Antikörper mit jeweils einer der gewünschten Spezifitäten produzieren, fusioniert und rekombinante Zelllinien identifiziert und isoliert, die Antikörper mit beiden Spezifitäten produzieren.

Das der Erfindung zugrunde liegende Problem kann sowohl durch bispezifische als auch trispezifische Antikörper gelöst werden, sofern sie die im Anspruch 1 gekennzeichneten Eigenschaften und Wirkungen aufweisen. Nachfolgend wird die Herstellung von Antikörpern mit Zwei- und Dreispezifitäten näher beschrieben. Die Bereitstellung derartiger bispezifischer und trispezifischer Antikörper gehört zum Stand der Technik, und auf die derartige Herstellungstechniken beschreibende Literatur wird hier voll inhaltlich Bezug genommen.

Die Herstellung von Antikörpern mit drei Spezifitäten, sogenannten trispezifischen Antikörpern, durch die das der Erfindung zugrundeliegende Problem ebenfalls lösbar ist, kann beispielsweise derart erfolgen, daß an eine der schweren Ig-Ketten eines bispezifischen Antikörpers eine dritte Antigenbindungsstelle mit einer weiteren Spezifität, z. B. in Form eines "single chain variable fragments" (scFv), angekoppelt wird. Das scFv kann beispielsweise über einen

#### -S-S(G<sub>4</sub>S)<sub>n</sub>D-I-Linker

an eine der schweren Ketten gebunden sein (S = Serin, G = Glycin, D = Aspartat, I = Isoleucin).

Analog dazu können trispezifische F(ab)<sub>2</sub>-Konstrukte hergestellt werden, indem die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette einer Spezifität eines bispezifischen Antikörpers ersetzt werden durch ein scFv mit einer dritten Spezifität, während die CH2-CH3-Regionen der schweren Kette der anderen Spezifität beispielsweise durch Einbau eines Stopcodons (am Ende der "Hinge"-Region) in das codierende Gen, z. B. mittels homologer Rekombination, entfernt werden (siehe Abb. 4).

Möglich ist auch die Herstellung trispezifischer scFv-Konstrukte. Hierbei werden drei VH-VL-Regionen, die drei verschiedene Spezifitäten repräsentieren, hintereinander in Reihe angeordnet (Abb. 5).

Erfindungsgemäß werden z. B. intakte bispezifische Antikörper verwendet. Intakte bispezifische Antikörper sind aus zwei Antikörper-Halbmolekülen (je eine H- und L-Immunglobulinkette), die jeweils eine Spezifität repräsentieren, zusammengesetzt, und besitzen darüber hinaus, wie normale Antikörper auch, einen Fc-Teil mit den bekannten Effektorfunktionen. Sie werden bevorzugt durch die Quadrom-Technologie hergestellt. Dieses Herstellungsverfahren ist beispielhaft in der DE-A-44 19 399 beschrieben. Auf diese Druckschrift, auch bzgl. einer Definition der bispezifischen Antikörper, wird zur vollständigen Offenbarung vollinhaltlich Bezug genommen. Selbstverständlich sind auch andere Herstellungsverfahren einsetzbar, solange sie zu den erfindungsgemäß notwendigen intakten bispezifischen Antikörpern der obigen Definition führen.

Beispielsweise können in einem neu entwickelten Herstellungsverfahren (8) intakte bispezifische Antikörper in ausreichender Menge produziert werden. Die Kombination von 2 bispezifischen Antikörpern gegen 2 unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (z. B. c-erb-B2, ep-cam, beispielsweise GA-733-2 = C215) auf den Mammakarzinomzellen minimiert die Gefahr, daß Tumorzellen, die nur ein Antigen exprimieren, unerkannt bleiben.

Bispezifische Antikörper können mit einem Bindungsarm an den T-Zellrezeptor-Komplex der T-Zelle, mit dem zweiten Bindungsarm an tumorassoziierte Antigene auf der Tumorzelle binden. Sie aktivieren dabei T-Zellen, die durch Freisetzung von Cytokinen oder Apoptose-vermittelnde Mechanismen die Tumorzellen zerstören. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, daß T-Zellen im Rahmen der Aktivierung mit bispezifischen Antikörpern tumorspezifische Antigene über ihren Rezeptor erkennen und dadurch eine dauerhafte Immunisierung eingeleitet wird (Abb. 1B). Von besonderer Bedeutung ist dabei der intakte Fc-Teil des bispezifischen Antikörpers, der die Bindung an akzessorische Zellen wie z. B. Monozyten/Makrophagen/Dendriten vermittelt und diese veranlaßt, selbst zytotoxisch zu werden und/oder gleichzeitig wichtige kostimulatorische Signale an die T-Zelle weiterzugeben (Abb. 1).

Auf diese Weise kann auch eine T-Zellantwort gegen bislang unbekannte, tumorspezifische Peptide induziert werden.

Durch Redirektion von u. U. anergisierten, tumorspezifischen T-Zellen an Tumorzellen mittels bsAk bei gleichzeitiger Kostimulation derartiger T-Zellen durch akzessorische Zellen, welche an den Fc-Teil des bsAk binden, wird die Anergie der CTLs aufgehoben werden. D.h. eine im Patienten gegen den Tumor existierende T-Zell-Toleranz wird erfindungsgemäß mittels intakter bsAk gebrochen und damit eine dauerhafte Tumormimmunität induziert.

Hierfür gibt es erste in vivo-Daten aus Mausversuchen, die auf eine derartige dauerhafte Tumormimmunität nach Behandlung mit einem syngenen Tumor und intakten bsAk hinweisen. In diesen Versuchen überlebten insgesamt 14 von 14 Tieren, die nach einer ersten Tumorinjektion erfolgreich mit bsAk behandelt werden konnten, eine weitere Tumorinjektion 144 Tage nach der ersten – ohne eine erneute Gabe von bsAk (siehe Beispiel 1).

Bei der erfindungsgemäßen Immunisierungsstrategie werden beispielsweise intakte bsAk verwendet, die in der Lage sind, Fc<sub>Y</sub>RI+ Zellen über ihren Fc-Teil zu binden. Außerdem besitzen die erfindungsgemäß verwendeten bsAk als zweite Spezifität beispielsweise anti-CD3 neben der tumorzellbindenden Spezifität, d. h. sie sind befähigt, durch den zweiten

Bindungsarm an T-Zellen zu binden. Mit den erfundungsgemäß verwendeten bsAk werden also T-Zellen aktiviert und gegen die Tumorzellen redirigiert.

Es wurde auch versucht, durch Behandlung mit bispezifischen F(ab')2-Fragmenten mit den Spezifitäten anti-c-erb-B2  $\times$  antiCD64 eine Tumorimmunität zu erreichen. Der Hauptnachteil von bsF(ab')2-Fragmenten liegt darin, daß aufgrund der verwendeten Spezifitäten lediglich Fc $\gamma$ RI+ Zellen an den Tumor redirigiert werden. T-Zellen werden durch diesen bispezifischen Antikörper nicht an den Tumor redirigiert. Die bsF(ab')2-Fragmente besitzen zwar auch das Potential zur direkten Tumorzerstörung, sind aber nicht in der Lage, selber eine Tumorimmunität zu etablieren. Dazu ist nur die T-Zelle mit ihrem spezifischen T-Zellrezeptor befähigt. Die Fc $\gamma$ RI+ Zellen können zwar indirekt durch Präsentation von tumorspezifischen Peptiden (über MHC I bzw. MHCII) nach z. B. Phagozytose von Tumorzellbestandteilen tumorspezifische T-Zellen aktivieren, die Effizienz der Induktion einer Tumorimmunität ist hier aber nicht ganz so hoch (nur bei 30% der Patienten).

Weitere Vorteile von intakten bsAk mit der Fähigkeit zur Redirektion von T-Zellen gegenüber den o.g. bsF(ab')2 Fragmenten sind im einzelnen:

- 15 1. An intakte bsAk können Fc-Rezeptor positive Zellen binden und einerseits über ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) direkt zur Tumorzerstörung beitragen sowie andererseits wie oben näher ausgeführt zur T-Zellaktivierung.
- 20 2. bsAk mit Fc-Anteil besitzen eine wesentlich längere Zirkulationszeit als z. B. bsF(ab')2 oder bs(scFv) Antikörperfragmente, so daß wesentlich geringere Dosen intakter Ak-Moleküle für eine vergleichbare anti-Tumorwirkung notwendig sind.
- 25 3. Durch die erfundungsgemäße Verwendung intakter bispezifischer Antikörper sollen insbesondere residuelle Tumorzellen/Mikrometastasen zerstört werden. Im Gegensatz zur Behandlung solider Tumoren oder größerer Metastasen, bei denen die oben erwähnten Antikörperfragmente Vorteile besitzen könnten, da sie aufgrund ihrer gerin- 30 geren Größe eine bessere Tumorentration ermöglichen.
4. Durch intakte T-Zell-redirigierende bsAk werden auch anergisierte tumorspezifische T-Zellen an die Tumorzelle herangeführt, die erfundungsgemäß direkt am Tumor reaktiviert werden können. Dies kann durch ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen nicht erreicht werden.
5. Ein bsF(ab')2-Fragment mit den Spezifitäten anti-CD64Xanti-tumorassoziiertes Antigen kann lediglich eine Tumorimmunität in 30% der Patienten erzielen, während erfundungsgemäß in Mausversuchen mit T-Zell-redirigierenden intakten bsAk ein Schutz in 100% der Tiere erzielt werden konnte.

Die Bindung des bsAk an Fc $\gamma$ -RI besitzt zwei wesentliche Vorteile im Hinblick auf eine optimale anti-Tumorwirksamkeit:

35 Fc $\gamma$ -RI positive Zellen besitzen die Fähigkeit mittels ADCC Tumorzellen zu eliminieren (11) und können insofern synergistisch zur anti-Tumorwirkung der durch den bsAk an die Tumorzelle herangeführten cytotoxischen T-Zellen beitragen (13).

40 1. Fc $\gamma$ -RI positive Zellen (wie z. B. Monozyten/Makrophagen/-Dendriten) sind in der Lage, wichtige kostimulatorische Signale, ähnlich wie bei der Antigen-Präsentation, der T-Zelle zu liefern und damit eine Anergisierung der T-Zelle zu verhindern. Wie in Abb. 1 gezeigt können weiterhin, als erwünschtes Nebenprodukt, aufgrund der durch intakten bsAk vermittelten Interaktion von T-Zelle mit akzessorischer Zelle und Tumorzelle sogar T-Zellen, deren T-Zellrezeptor tumorspezifische Peptide (über MHC Antigene auf der Tumorzelle präsentiert) erkennt, stimuliert werden. Die für eine korrekte Aktivierung der T-Zelle notwendigen Kostimuli würden in dieser Konstellation von der akzessorischen Zelle (z. B. Monocyt) geliefert werden. Insofern sollte der erfundungsgemäßen Lösung neben der direkten T-Zellrezeptor-unabhängigen durch bsAk vermittelten Tumorzerstörung (Abb. 1A), ebenfalls tumorspezifische T-Zellen aktivieren und generieren (Abb. 1B), die nach Abbau der bsAk weiterhin im Patienten patrouillieren. D.h. mittels intakter bsAk kann ähnlich wie bei gentherapeutischen Ansätzen (z. B. durch Einbau von kostimulatorischen Antigenen wie B-7 in die Tumorzelle) die Tumortoleranz im Patienten durchbrochen werden.

50 50 Günstig in diesem Zusammenhang ist weiterhin, daß die Expression von Fc $\gamma$ -RI nach G-CSF-Behandlung auf den entsprechenden Zellen hochreguliert wird.

#### Beispiel

55 Zur Prüfung der Frage, ob bispezifische Antikörper eine Tumorimmunität induzieren können, wurden C57BL/6 Mäusen zunächst  $5 \times 10^3$  syngene B16 Tumorzellen injiziert. Zwei Tage später wurde eine Gruppe von Mäusen (Anzahl 18) mit einem mittels Quadrom-Technologie (8) hergestellten intakten bsAk behandelt, welcher eine Zielstruktur epCAM (C215 = tumorassoziiertes Antigen) auf der Tumorzelle sowie CD3 auf T-Zellen erkennt. Dieser bsAK hat die Subklassenkombination IgG2a/Ratte IgG2b. Eine zweite Gruppe (Anzahl 6) erhielt lediglich eine äquimolare Menge von Fab-Fragmenten der beiden im bsAk enthaltenen Spezifitäten. Während alle Tiere der Fab-Kontrollgruppe innerhalb von 56 Tagen verstarben oder eingeschläfert werden mußten, überlebten 14 der 18 mit bsAk behandelten Tiere. 144 Tage nach der ersten Injektion von Tumorzellen wurde den überlebenden 14 Tieren erneut eine Dosis von 750 B16 Tumorzellen, diesmal ohne Gabe von bsAk, i.p. injiziert. Zur Kontrolle wurde 5 unbehandelten Tieren dieselbe Tumorzellzahl verabreicht. Während das letzte Tier der unbehandelten Kontrollgruppe 66 Tage nach Tumorinjektion eingeschläfert werden mußte, überlebten alle mit bsAk behandelten Tiere (Überwachungszeitraum: 120 Tage nach zweiter Tumorzell-Injektion). Siehe auch Abb. 2A und B: Überlebenskurven der beiden aufeinanderfolgenden, oben beschriebenen, Experimente.

Diese Versuche zeigen, daß es möglich ist, mit den erfundungsgemäß bereitgestellten bispezifischen Antikörpern, aber

auch mit den trispezifischen Antikörpern, eine lang andauernde Tumorimmunität zu induzieren. Es ist davon auszugehen, daß diese Ergebnisse auch auf den Menschen zu übertragen sind, wobei hier von einer Tumor-Langzeitimmunität zumindest über mehrere Jahre hinweg auszugehen ist.

Nachweis der Induktion einer humoralen Immunantwort mittels intakter bsAk und deren prognostische Bedeutung für das Überleben von Patienten oder Tieren

5

#### Beschreibung

Neben der zellulären Immunität, die hauptsächlich von den T-Zellen getragen wird, spielt die humorale Immunität bei der Tumor-Erkennung und -Zerstörung eine ebenso wichtige Rolle. Dies belegen eine Reihe von Untersuchungen, beispielsweise eine Arbeit von Rodolfo et al. (J. Immunol. 157, 5536, 1996). Rodolfo et al. konnten zeigen, daß (1) durch die Gabe von IL-12 bzw. IL-2 transduzierter Tumorzell-Vakzine tumorspezifische T-Zellen induziert werden; (2) eine effektive humorale Immunantwort mit Komplement-fixierenden Antikörpern nur mit den IL-12 transduzierten Tumorzellen erzeugt werden konnte. Interessanterweise überlebten in diesen Versuchen nur Tiere, die Komplement-fixierende Antikörper mit anti-Tumorspezifität entwickelt hatten.

10

In erfindungsgemäß durchgeführten *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, daß mittels der hier beschriebenen intakten bispezifischen Antikörper aufgrund der Bindung und Aktivierung von Fc $\gamma$ -Rezeptor positiven Zellen (siehe Abb. 1) von diesen Cytokine, beispielsweise IL-12, gebildet und sezerniert werden (siehe Anhang Tabelle 1). Insofern konnte mit den hier beschriebenen intakten bsAk ohne Gentransfer die Produktion von Cytokinen induziert werden, die ansonsten nur mit Gentransfer im Rahmen von gentherapeutischen Ansätzen zur Expression gebracht werden können. Die Beobachtung ist deshalb so wichtig, weil IL-12 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Induktion einer anti-Tumor-Immunität spielt.

15

In den im obigen Bsp. 1 gezeigten Tierversuchen konnten in den überlebenden Mäusen, nach bsAk-Behandlung, am Tag 143 nach Tumor-Gabe im Schwanzblut tumorreaktive Komplement-fixierende Antikörper nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß für das Überleben der Tiere derartige Antikörper zumindest mit verantwortlich waren, da in verstorbenen Tieren keine oder nur geringe Mengen dieser Antikörper nachgewiesen werden konnten (Tab. 2).

20

Die vorstehend beschriebenen Versuche wurden anhand bispezifischer Antikörper durchgeführt. Anstelle der bispezifischen können aber auch die in der Anmeldung beschriebenen trispezifischen Antikörper mit den gleichen Ergebnissen eingesetzt werden.

25

Wie beschrieben werden durch die Behandlung mit den erfindungsgemäß bereitgestellten bispezifischen und trispezifischen Antikörpern tumorreaktive Komplement-bindende Antikörper generiert, die für die Induktion einer humoralen Immunantwort stehen. Dies und die Anregung der Produktion von Cytokinen wie IL-12, dürfte für die erfindungsgemäß Induktion einer Langzeit-Tumorimmunität zumindest mit verantwortlich sein. Es ist deshalb auch möglich, die Menge an Komplement-bindenden tumorreaktiven Antikörpern, die durch Behandlung mit bispezifischen oder trispezifischen Antikörpern gemäß der Erfahrung induziert wurden, zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs (Prognostik) eines Tumorpatienten zu verwenden. Je höher die Menge an tumorreaktiven Komplementfixierenden Antikörpern ist, desto günstiger die Prognostik des Tumorpatienten.

30

Die erfindungsgemäß offenbare Verwendung z. B. intakter bispezifischer Antikörper erfolgt nach der Behandlung eines Primärtumors, bevorzugt bei Patienten in einer minimal residual disease (MRD)-Situation. Nur bei Patienten mit wenigen verbliebenen Tumorzellen, bei denen allerdings die Gefahr eines Rezidivs hoch ist, wird die erfindungsgemäß Verwendung intakter bispezifischer Antikörper Bedeutung erlangen.

35

Tabelle 1

40

Anstieg von Oberflächenantigenen auf CD14+Zellen (Makrophagen, Monozyten) bzw. Sekretion von Cytokinen nach *in vitro* Inkubation von PBMC mit intakten bsAk und Tumorzellen nach 20h

45

Antigen	ohne Ak	mit bsAk
CD40	+	++
CD80 (B-7.1)	+	++
CD86 (B-7.2)	+	++
CD25 (IL-2R)	+	+++
MHC II	+	+(-)
bsAk	-	+

50

Mit PCR nachgewiesene Cytokine : IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 (nur mit bsAk); TNF- $\alpha$  (sowohl mit bsAk als auch mit der Kombination der parentalen Antikörper)

55

60

65

Tabelle 2

B16-Melanom Rechallenge Versuch (siehe Bsp. 1). Testung der Seren (aus Schwanzblut) von überlebenden Tieren (1-13) sowie am Tumor verstorbener Tiere (14-17) auf tumorreaktive Antikörper

5

10

15

20

25

30

35

Maus	Reaktivität mit B16-C215 Zellen in % (Serum Tag 0)	Reaktivität mit B16-C215 Zellen in % (Serum am Tag des Einschlafers bzw. Todes)	Reaktivität mit B16-C215 Zellen in % (Serum Tag 143)	Komplement-fixierende Subklasse mIgG2a	nicht Komp.-fix. Subklasse mIgG1
1	5		87 <sup>a)</sup>	+	- <sup>b)</sup>
2	6		42	+	-
3	5		70	+	-
4	4		73	+	-
5	5		30	+	-
6	5		66	+	-
7	5		57	+	-
8	6		71	+	-
9	5		47	+	-
10	5		49	+	-
11	6		69	+	-
12	5		40	+	-
13	5		54	+	-
14	4	8		-	-
15	5	14		-	-
16	6	10		-	-
17	5	18		+	-
Kontrollserum	3	4	2	-	-

a) Die Messungen wurden im FACScan (Becton-Dickinson) durchgeführt. Die tumorgebundenen Antikörper wurden mit polyklonalem fluoreszenzmarkiertem Ratte anti-Maus Antikörper nachgewiesen.

40

Der Zahlenwert ist ein Maß für die Fluoreszenzintensität

b) Untersuchung der tumorreaktiven Mausseren wie unter a) aber mit Isotyp-spezifischen Nachweisantikörpern gerichtet gegen mIgG2a (Komplement-fixierend) bzw. mIgG1 (nicht Komplement-fixierend)

45

#### Literatur

1. Petersen et. al., Carboplatin, Melphalan, Mitoxanthrone and Thiotepa (PANT) as a new preparative regimen in patient undergoing marrow ablative therapy for advanced solid cancer followed by peripheral blood stem cell rescue – a phase I dose escalation trial. *Experimental Hematology* 1995, 23 (8), 761 (abstract #72)
2. Fields et al. Cytokeratin 19 in bone marrow detected by PCR predicts relapses in patients with chemoresponsive metastatic breast cancer undergoing high dose chemotherapy and autologous stem cell rescue. *Experimental Hematology* 1995, 23 (8), 785 (abstract #158)
3. Rumi et al. Immune reconstitution following positive selected CD34-positive progenitor cell transplantation: A flow cytometric study. *Experimental Hematology* 1995, 23 (8), 756 (abstract #51)
4. Mackall et al. Age, thymopoiesis and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy, *New England Journal of Medicine* 1995 , 332 (3), 1437
5. Weiner & De Gast, Bispecific monoclonal antibody therapy of B-cell malignancy, *Leukemia and Lymphoma*, 1995, 16 : 199
6. Bolhuis et al. Adoptive immunotherapy of ovarian carcinoma with bs-mAb-targeted lymphocytes: a multicenter study. *Int. J. Cancer Sup.*, 1992 7 : 78,
7. van Houten AA, Haagen IA, Clark M, Geerars A, de Lau W, Bast EJEG, de Gast GC: First results of intravenous application of bispecific antibody (CD3/CD19; SHR-1) to patients with CD19 positive B cell malignancies, a phase I study. *Exp. Hematol.*, 1993 21 : 1120,
8. Lindhofer et al, Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies, *J. Immunology* 1995, 155 : 219
9. Braun et al, Detection of minimal residual disease in bone marrow of patients with breast, cervical and ovarian

cancer, Experimental Hematology 1995, 23 (8), 762 (abstract #78)

10. Randomisierte Studie "Adjuvante Hochdosismchemotherapie mit peripherer Blutstammzelltransplantation im Vergleich mit Standardtherapie bei Hochrisikopatientinnen mit Mammakarzinom" der interdisziplinären Arbeitsgruppe Mammakarzinom der Deutschen Krebsgesellschaft (Studienaktivierung: 1.10.95). 5

11. Valerius et al., Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc $\gamma$ RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy, Blood, 1993, 82 : 931-939

12. Haagen et al., Interaction of human monocyte Fc $\gamma$  receptors with rat IgG2b, J. Immunology., 1995, 154 : 1852-1860

13. Weiner et al., The role of T cell activation in anti-CD3 x antitumor bispecific antibody therapy, J. Immunology, 1994, 152 : 2385

14. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339 : 71-85, 1992.

15. Nitta et al., Preliminary trial of specific targeting therapy against malignant glioma. Lancet 335 : 368, 1990

16. Peters, W.P., Shpall, E.J., Jones, R.B., and et al., High dose combination alkylating agents with bone marrow support at initial treatment of metastatic breast cancer. J Clin Oncol 6 : 1368-1375, 1988.

17. Antman, K., Ayash, L., Elias, A., and et al., A phase II study of high dose cyclophosphamide, thiotepa and carboplatin with autologous marrow support in women with measurable advanced breast cancer responding to standard dose therapy. J Clin Oncol 10 : 102-110, 1992.

18. Bitran, J.D., Samuels, B., Klein, L., Hanauer, S., Johnson, L., Martinec, J., Harris, E., Kempler, J., and White, W. Tandem high-dose chemotherapy supported by hematopoietic progenitor cells yields prolonged survival in stage IV breast cancer. Bone Marrow Transplant 17 : 157-162, 1996.

19. Bezwoda, W.R., Seymour, L., and Dansey, R.D. High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer. A randomized trial. J Clin Oncol 13 : 2483-2489, 1995.

20. Gale et al. Autotransplants in leukaemia. Lancet 1989, ii :315

21. Gribben et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous BMT for B cell lymphoma. New Engl. J. Med. 1991, 325 : 1525

22. Kaneko et al. Combination of IL-2 stimulated lymphocytes and bispecific antibodies that efficiently lyse leukemic cells does not affect bone marrow CD34-positive stem cell function in vitro. Bone Marrow Transpl. 1994, 14 : 213

23. Haagen et al. The efficacy of CD3XCD19 bispecific antibody (bsAb) in a clonogenic assay: The effect of repeated addition of bsAb and IL-2. Elood 1995, 85 : 3208

24. 30

## Patentansprüche

35

1. Verwendung eines intakten bispezifischen oder trispezifischen Antikörpers mit den nachfolgenden Eigenschaften und Wirkungen:

- (a) bindet an eine T-Zelle und vermittelt ihr ein 1. Aktivierungssignal;
- (b) bindet an tumorassoziierte Antigene auf einer Tumorzelle;
- (c) bindet durch seinen Fc-Teil (bei bispezifischen Antikörpern) oder eine dritte Spezifität (bei trispezifischen Antikörpern) an den Fc-Rezeptor von Fc-Rezeptor positiven Zellen;
- (d) aktiviert die Fc-Rezeptor positive Zelle durch seine Bindung an die Fc-Rezeptor positive Zelle, wodurch die Expression von Cytokinen und/oder von kostimulatorischen Antigenen initiiert oder erhöht wird;
- (e) die kostimulatorischen Antigene übertragen an die T-Zelle zumindest ein 2. Aktivierungssignal, das für eine physiologische Aktivierung der T-Zelle benötigt wird, wobei sich diese Aktivierung in der Hochregulation von Aktivierungsmarkern, der Zerstörung der Tumorzelle und/oder in einer Proliferation der T-Zelle zeigt; zur Induktion einer Tumorimmunität bei Mensch und Tier.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper weiterhin zur Reaktivierung von in Anergie befindlichen, tumorspezifischen T-Zellen befähigt ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper weiterhin befähigt ist, die tumorspezifischen T-Zellen, die über den T-Zell-Rezeptor ein tumorspezifisches Peptid, welches über MHC Klasse I und/oder Klasse II auf Tumorzellen präsentiert wird, erkennen, nach Bindung durch den bispezifischen oder trispezifischen Antikörper wie unter (e) beschrieben ebenfalls zu aktivieren.

4. Verwendung nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur Induktion von tumorreaktiven Komplement-bindenden Antikörpern und damit zur Induktion einer humoralen Immunantwort befähigt ist.

5. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper über CD3 oder CD2, CD5, CD28 und/oder CD44 an die T-Zelle bindet.

6. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur Bindung an Fc-Rezeptor positive Zellen befähigt ist, die einen Fc $\gamma$ -Rezeptor I, II oder III aufweisen.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur Bindung an Monozyten, Makrophagen und/oder Dendriten als Fc $\gamma$ -Rezeptor I positive Zellen befähigt ist.

8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression von CD40, CD80, CD86, ICAM-1 und/oder LFA-3 als kostimulatorische Antigene oder/und die Sekretion von Cytokinen durch die Fc-Rezeptor positive Zelle initiiert oder erhöht wird.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 und/oder TNF- $\alpha$  sind.

# DE 197 10 497 C 2

10. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung an die T-Zelle über den T-Zell-Rezeptor-Komplex der T-Zelle erfolgt.

11. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der bispesifische Antikörper ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumorassozierter Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper ist.

12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der bispesifische Antikörper ein heterologer Ratte-/Maus bispezifischer Antikörper ist.

13. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der bispesifische Antikörper ein heterologer bispezifischer Antikörper ist, ausgewählt aus einer oder mehreren der nachfolgenden Isotypkombinationen:

15. Ratte-IgG2b/Maus-IgG2a,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG2b,  
Ratte-IgG2b/Maus-IgG3,

15. Ratte-IgG2b/Human-IgG1,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG2,  
Ratte-IgG2b/Human-IgG3[orientaler Allotyp G3m(st) = Bindung an Protein A],  
Ratte-IgG2b/Human-IgG4,  
Ratte-IgG2b/Ratte-IgG2c,

20. Maus-IgG2a/Human-IgG3 [kaukasische Allotypen G3m(b+g) = keine Bindung an Protein A, im folgenden mit \* gekennzeichnet]  
Maus-IgG2a/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Maus-IgG2a/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Maus-IgG2a/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]

25. Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]

30. Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-CH2-CH3]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG2-[Hinge]-CH2-CH3]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG3-[Hinge]-CH2-CH3, orientaler Allotyp]  
Ratte-IgG2b/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-CH2-CH3]-Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]

35. Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]  
Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]

40. Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]  
Human-IgG1/Maus-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]

45. Human-IgG1/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG2-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Human-IgG4/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG4-[Hinge]-Human-IgG4 [N-terminale Region von CH2]-Human-IgG3\* [C-terminale Region von CH2: > AS-Position 251]-Human-IgG3\* [CH3]

50. Maus-IgG2b/Ratte-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Maus-IgG2b/Human-[VH-CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3]  
Maus-IgG2b/Maus-[VH,CH1,VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human-IgG3\*- [CH2-CH3].

55. 14. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der trispezifische Antikörper ein anti-CD3 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD2 X anti-Tumorassozierter Antigen- und/oder anti-CD5 X anti-tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD28 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen- und/oder anti-CD44 X anti-Tumor-assoziiertes Antigen-Antikörper mit einem zusätzlichen anti-Fc-Rezeptor-Bindungsarm ist.

15. Verwendung eines Antikörpers nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche in einer Menge von 5 µg-10 mg/Patient in einer minimal residual disease (MRD)-Situation.

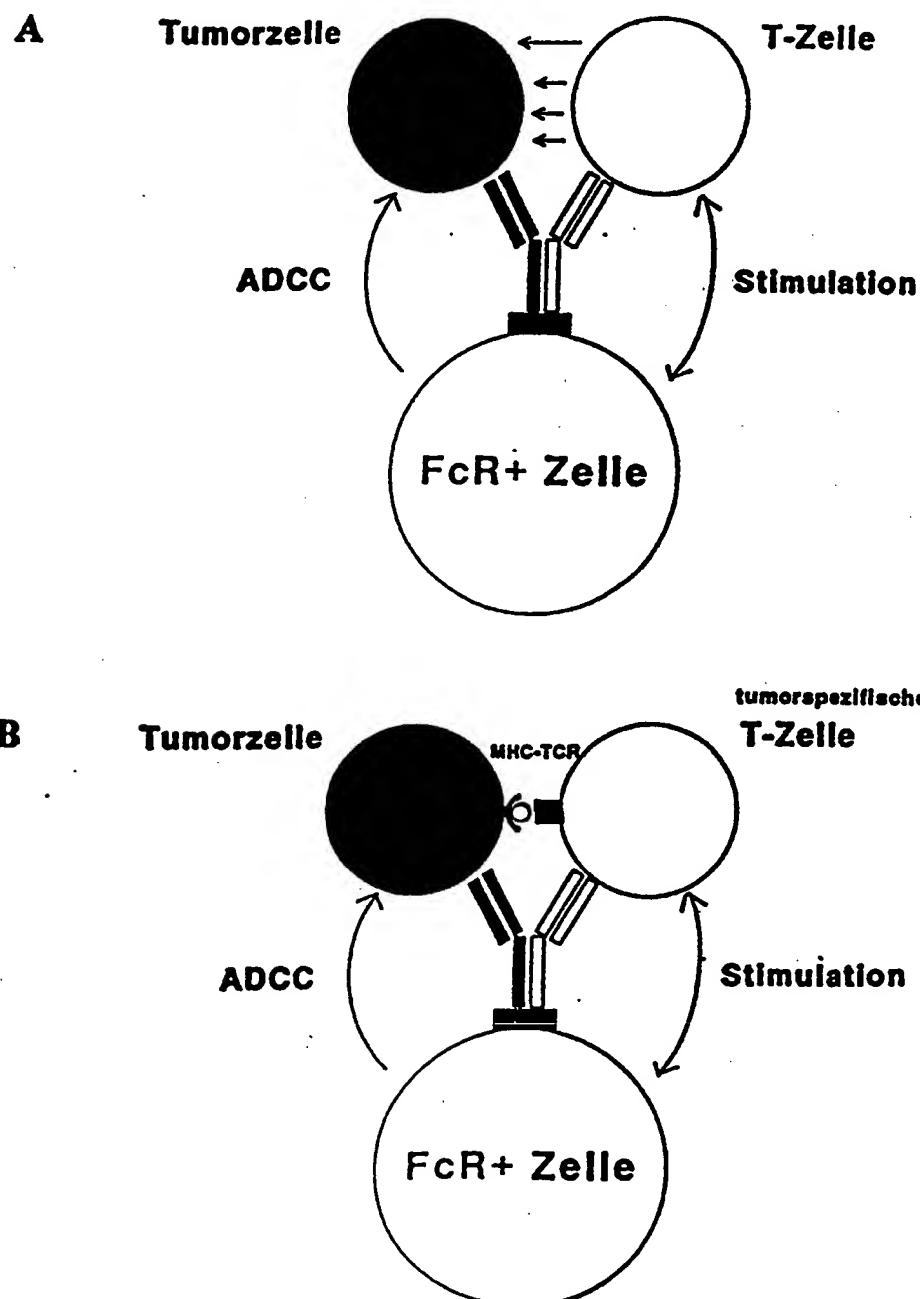
Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

60

65

**- Leerseite -**

Abb.1:  
Die Rolle von akzessorischen Zellen bei der Tumor-Immuntherapie  
mittels bispezifischer Antikörper



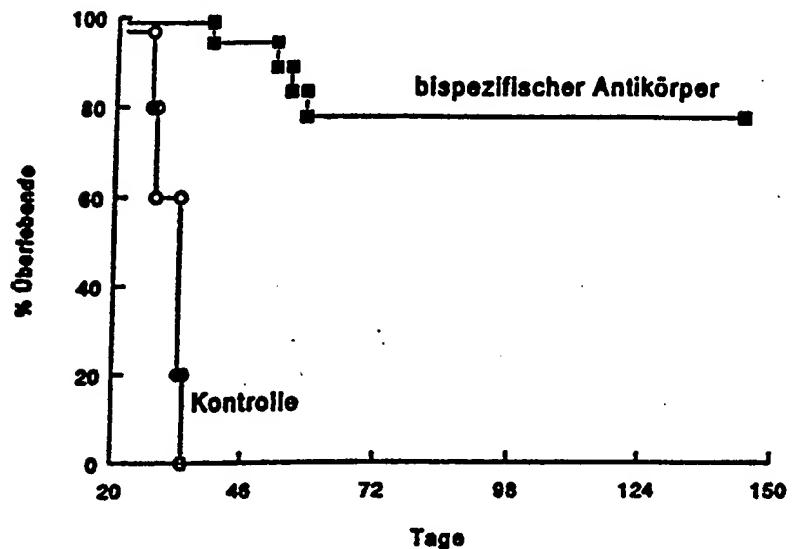
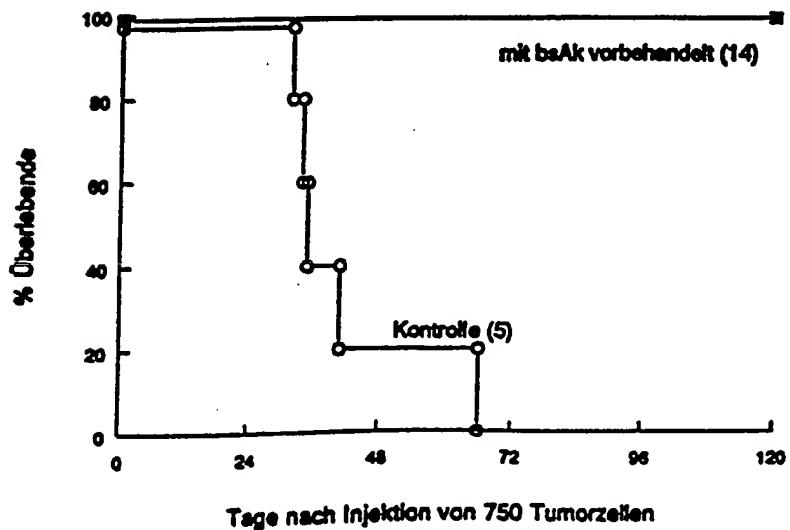
**Abbildung 2****A Überleben nach Injektion von  $5 \times 10^3$  B16 Melanomzellen und bispez. Antikörpern****B Erneute Tumorinjektion am Tag 144**

ABBILDUNG 3

Heterologer chimerisierter bispezifischer Antikörper der Isotypenkombination: Maus-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1/Ratte-[VH-CH1, VL-CL]-Human-IgG1-[Hinge]-Human IgG3-[CH2-CH3]

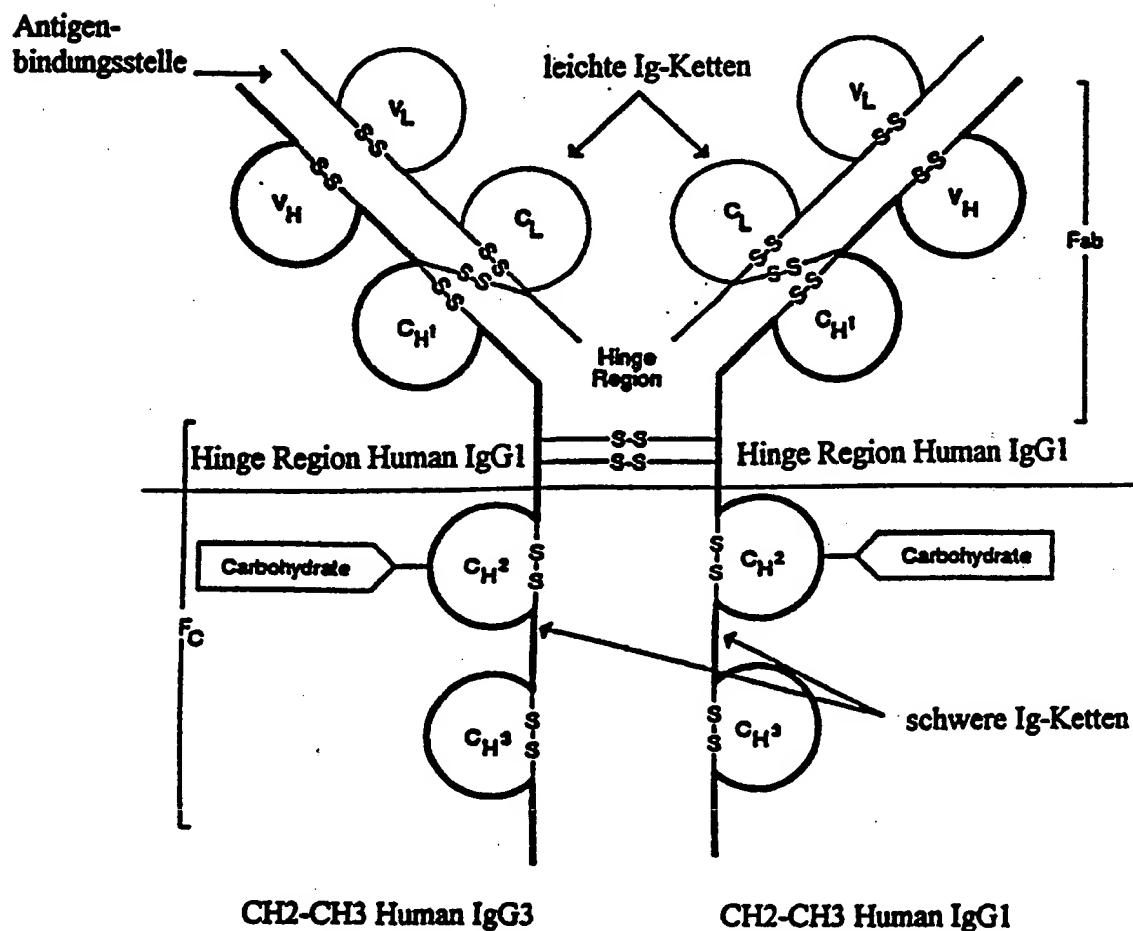


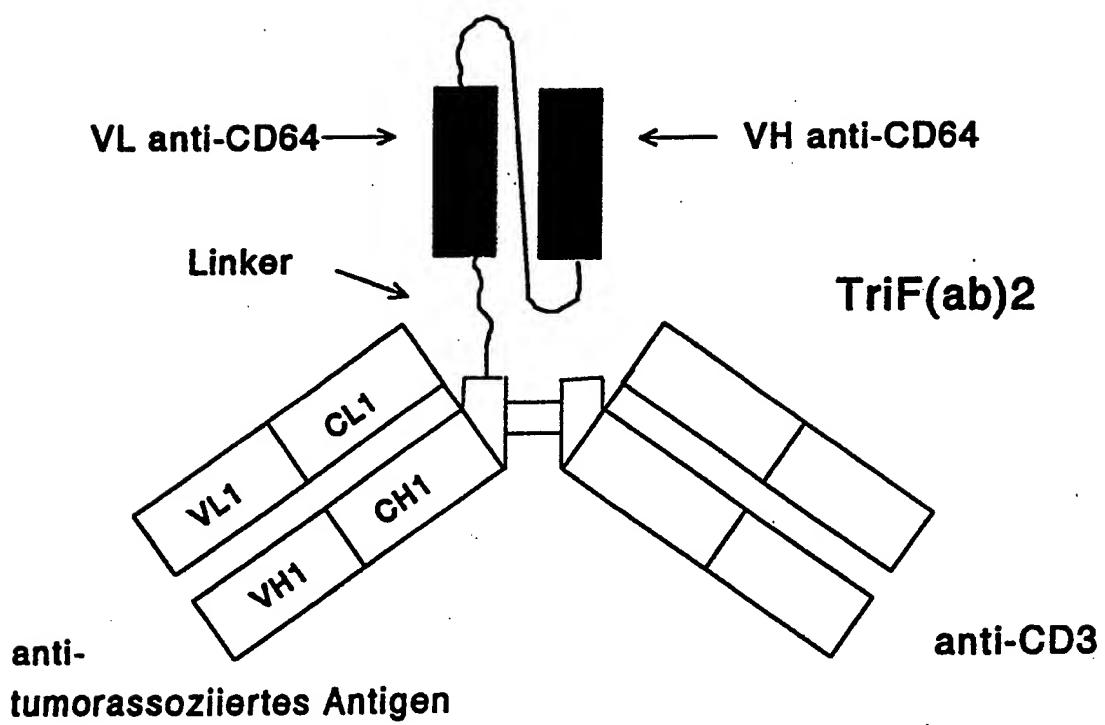
ABBILDUNG 4

ABBILDUNG 5

